

細胞共培養系に見られるクラスター およびネットワーク構造の形成

原田崇広

京都大学大学院理学研究科 物理学・宇宙物理学専攻

Takahiro Harada

Department of Physics, Graduate School of Science,
Kyoto University

概要

ラット心臓の初代培養系において観測された、非常に遅い時間スケールで起こるクラスター及びネットワーク構造の形成過程について紹介する。系は自律的に拍動する心筋細胞と、拍動せずに動き回り分裂を行う細胞種（主に繊維芽細胞や血管内皮細胞など）から成り、この培養系を顕微鏡下長時間観察したところ、約1週間程度の時間スケールにおいて特徴的なクラスター構造を形成することが見いだされた。拍動を阻害する薬剤の効果などを検証した結果、このクラスター形成は心筋細胞の拍動によりお互いが引き合って進行するものと考えられる。本稿ではこの実験の詳細を述べ、現在考えられているメカニズムを紹介する。

1 はじめに

生物の心臓は規則的に収縮を繰り返す心筋細胞から構成されている。心臓内では心筋細胞は規則正しく配列され、そのために個々の細胞の収縮によって心臓全体が正しく収縮し、全身に血流を送るポンプとしての機能を果たしている。これまでも心筋細胞の収縮運動については、医学・生理学、薬学、生化学、また生物物理学など様々な分野にまたがった研究がなされ、その収縮機構については分子レベルから組織、器官のレベルまで非常に多くの事が分かってきている。また近年では非線形動力学の考え方が応用され、自発的に収縮する細胞同士がいかんしてお互いの同期をとり、全体として秩序ある収縮運動をすることができるか、またいかんして病的な状態においてそれが乱されるか、という研究も進んできている [1]。高等生物の器官のなかで最もよく理解されているものの一つに数えても良いであろう。

これまでに上記のような物理学的立場からこれまでに行われた研究では、「細胞同士の結合状態が与えられたとき、どのような収縮パターンが実現する

か」という（電気生理学的な）問題にもつばら重点が置かれていた。これは結合振動子系の非線形力学の応用問題として扱えることから、既に多くの研究が行われている [2, 3, 4, 5]。しかしながら実際の生体においては、心臓の形状や細胞間の結合の仕方などはあらかじめ与えられたものではなく、生物がその発生の過程で自ら獲得したものである。つまり「自発的に拍動する心筋細胞の集団において、その結合状態はどのように時間発展するか」という逆の観点は生物学的に非常に重要であり、また物理の問題として見た場合にも新しい側面を含んでいると言える。

このような問題を考えるためには、心筋細胞の拍動の時間スケールよりもずっと遅い時間スケールにおいて、細胞間ネットワークの状態がどのようにして時間発展するか、またその遅いダイナミクスは速い時間スケールの運動である収縮運動とどのように関係しているか、という点に着目して実験を行う必要がある。そこで我々は心臓のモデルとして、より簡単な培養細胞系を採る。培養細胞系は擬2次元の系であるため、3次元的な実際の心臓の形状と直接対応づけることは難しい反面、実験操作や解析、また理論との対応はより容易になるという利点があるので、培養細胞系で何が起こりうるかを詳しく調べることに意味があると考えた。

本論文では、心筋細胞の培養系において見られる、特徴的なクラスターやネットワーク構造の形成について述べる。心筋細胞を繊維芽細胞などの他の細胞と共に培養した場合、心筋細胞同士が凝集してクラスターを形成することが見いだされた。またクラスター化の原因を調べるために、拍動阻害剤として知られる 2, 3-butanedione monoxime (BDM) [6] 存在下で細胞を培養した。その結果、心筋細胞の収縮が阻害された条件下ではクラスター形成も起こらなかった。このことから心筋細胞がその収縮によってお互い引き合う効果が重要であると推測できる。更にクラスター形成現象を画像解析によって定量的に調べた。また、クラスター化の途中で過渡的に形成されるネットワーク状構造と、高分子などのソフトマテリアルの分野で知られる粘弾性相分離現象との関連についても議論する。

2 実験系について

初代培養系 Matoba *et al.* [7] と同様の方法によって、細胞培養系を用意した。生後1日齢の Wister rat より心臓を単離し、collagenase にて消化した後、遠心分離によって細胞を回収した。Matoba *et al.* に従って、細胞懸濁液を 10cm 培養皿に移し、CO₂ インキュベータ (37°C、5% CO₂) で 60 min インキュベートした後、上清を回収した。

細胞は計数された後、目的の濃度になるように調整され、コラーゲンでコートされたプラスチックシャーレ及びガラスボトムディッシュに播種された。培養ディッシュは前述と同じ条件にてインキュベートされた。最初の 24 hr は培地として、Plating Medium (10% ウシ胎児血清と、0.1 mM 5-Bromo-2'-deoxyuridine を含む Dulbecco's modified Eagle's medium) を使い、その後 Exchanging Medium (10% ウシ新生児血清と、0.1 mM BrdU を含む Modified Eagle's Medium) に交換した。

観察 培養系の time-lapse 観察のために、顕微鏡用培養ステージ (Tokai Hit, IN-ONI-F2) を使用し、サンプルを 37°C、5% CO₂、飽和湿度の条件に保つ

た。ステージは倒立顕微鏡 (Olympus, IX-70) にマウントされ、10× 対物レンズにてサンプルを観察した。画像の取得には Digital Charge-Coupled-Device (CCD) Camera (Hamamatsu) を使い、画像取得ソフトウェア (Hamamatsu, AquaCosmos) にて制御した。

time-lapse 観察以外では、サンプルは室温 (25 °C)、大気中において、4× 対物レンズを用いて観察した。画像の取得には CCD カメラ (WATEC) を使い、画像は Digital Video Tape に録画された後、画像解析ソフト (Image J) を用いて解析された。

また細胞の核を可視化するためには蛍光色素 Hoechst 33342 を用いた。培養ディッシュは観察前に、 $0.1\mu\text{g/mL}$ の Hoechst 33342 を含む培地で 30 min インキュベートした後、蛍光色素を含まない培地に交換され、室温・大気中の蛍光顕微鏡によって観察された。画像は ICCD camera (Hamamatsu) を用いて取得し、記録・解析された。

画像解析 画像解析はソフトウェアとして Image J を用いて行われた。蛍光色素によって細胞核を可視化した蛍光画像において、まず low cut filter によって照明の非一様性を補正した後、適当な閾値で画像の二値化を行った。得られた二値画像は細胞核が輝点として分布したものになるが、細胞がクラスター化している部分ではある程度の大きさを持った塊となる。したがってこの二値化画像における輝点の大きさの分布を計測し、クラスターの大きさの目安とした。

実験プロトコル time-lapse 観察は細胞を 4.2×10^2 cells/mm² の細胞密度にて播種後、24hr Plating Medium にてインキュベートし、その後培地を Exchanging Medium に交換した後、開始した。画像の取得は 3 分毎に 1 週間続けられ、その間培地の交換は行わなかった。収縮運動の効果を見るために、同じく 4.2×10^2 cells/mm² の細胞密度にて播種後 24hr Plating Medium にてインキュベートし、2, 3-butanedione monoxime (BDM) を 0mM, 5mM, 10mM, 15mM それぞれ含む Exchanging Medium に交換し、その後 24hr 毎にインキュベータからサンプルを取り出し観察を行った。またクラスター化の定量化のためには、細胞をそれぞれ 3.2, 4.2, 5.3, 6.3, 7.4, 8.4×10^2 cells/mm² の細胞密度にて播種後、24hr Plating Medium にてインキュベートし、その後 BDM をそれぞれ 0, 5, 10, 15 mM ずつ含む Exchanging Medium に交換してインキュベートを続けた。培養 5 日目に前述の方法により核染色し、蛍光顕微鏡にて細胞の分布を観察した。

3 結果

3.1 クラスター化

Fig. 1 に播種 1 日後から 6 日目までにかけて time-lapse 観察した細胞の様子を示す。播種 1 日後の時点ではまだすべての細胞が基盤に接着しておらず、34hr 辺りにかけて、基盤に接着する細胞の数が増加しているが、細胞の分布はほぼ一様である。しかしその後徐々に細胞同士が寄り集まってクラスターを形成し (44 - 64 hr)、3 日目辺りには、クラスター同士が互いにつながりあったネットワーク状のパターンが形成される (74 - 94 hr)。しかしその後

もクラスターの凝集が続くために、クラスター間の連結が切れてしまい、最終的に丸い形状をしたクラスター群に分解する (124 - 154 hr)。実時間で系を観察すると、培養初期では約一割の細胞が自発的に拍動している事が分かった。この段階ではそれぞれの細胞の周期的収縮の周波数や位相はまちまちであり、ランダムである。培養中期 (44 - 94 hr) あたりになると、クラスター様構造をなす細胞達が主に拍動している。更に培養の後期段階 (104 hr から) では、発達したクラスターの部分でのみ拍動が認められた。この段階では特に全てのクラスターにおいて拍動が同期している。またクラスターの外部にも細胞が存在しているが、これらの細胞は拍動していなかった。これらの細胞は様々な方向へと活発に動き回っており、また分裂していることも確認された。これらのことから、クラスター外部に残っているこれらの細胞は心筋細胞ではなく、繊維芽細胞や血管内皮細胞などであると考えられる。

3.2 収縮の効果

Fig. 1 において、クラスターが凝集していく方向は、クラスターが拍動によって収縮する方向とほぼ対応していることが分かった。このことから、クラスター化には細胞の拍動が重要な寄与をしていると考えられる。この考えを裏付けるために、拍動阻害剤として知られている BDM 存在下で細胞を培養し、クラスター形成への影響を見た。BDM は筋繊維においてアクトミオシン系の相互作用を遮断することによって、筋繊維の収縮を阻害することが知られている [6]。Fujita らは筋原繊維の張力が BDM 濃度と共にほぼ線形に減少することを報告している [8]。我々の実験系においても、BDM は心筋細胞の拍動を阻害することが確認された。Fig. 2 には BDM 存在下で培養した細胞系で、培養 2 日目において自発的に拍動している細胞の割合を計数した結果を示す。図より、BDM が存在しない条件下では 10 % 前後の細胞が自発的に収縮しているが、BDM の量が増すにつれてその割合が大きく低下することが見て取れる。Fig. 3 には BDM 存在下で培養した細胞の 6 日目の様子を示す。図から見て取れる様に、BDM がいない場合にはクラスターの形成が見られるのに対し、10 mM 以上の BDM 存在下ではクラスター化はほとんど見られなかった。

高濃度の BDM 存在下では死んでしまう細胞がやや増える傾向が見られたため、BDM によるクラスター化の阻害は、心筋細胞が死んでしまうために起こっているという可能性も考えられる。これを排除するために、BDM 存在下で培養したサンプルから、8 日目に BDM を wash out した。BDM による収縮の阻害は wash out に対して可逆的であることがすでに報告されているが [6]、ここでも wash out 後のサンプルにおいて、BDM が存在していた量によらず、拍動が再開することが確認された。また、BDM 存在下において心筋細胞の拍動が停止してしまった条件下においても、繊維芽細胞などの自走性の細胞はなお動き回っていることが確認された。

3.3 定量化

以上にみたクラスター形成現象を定量化するため、細胞の撒き込み密度と培地に加える BDM の濃度を系統的に変えて実験を行った。Fig. 4 には、形

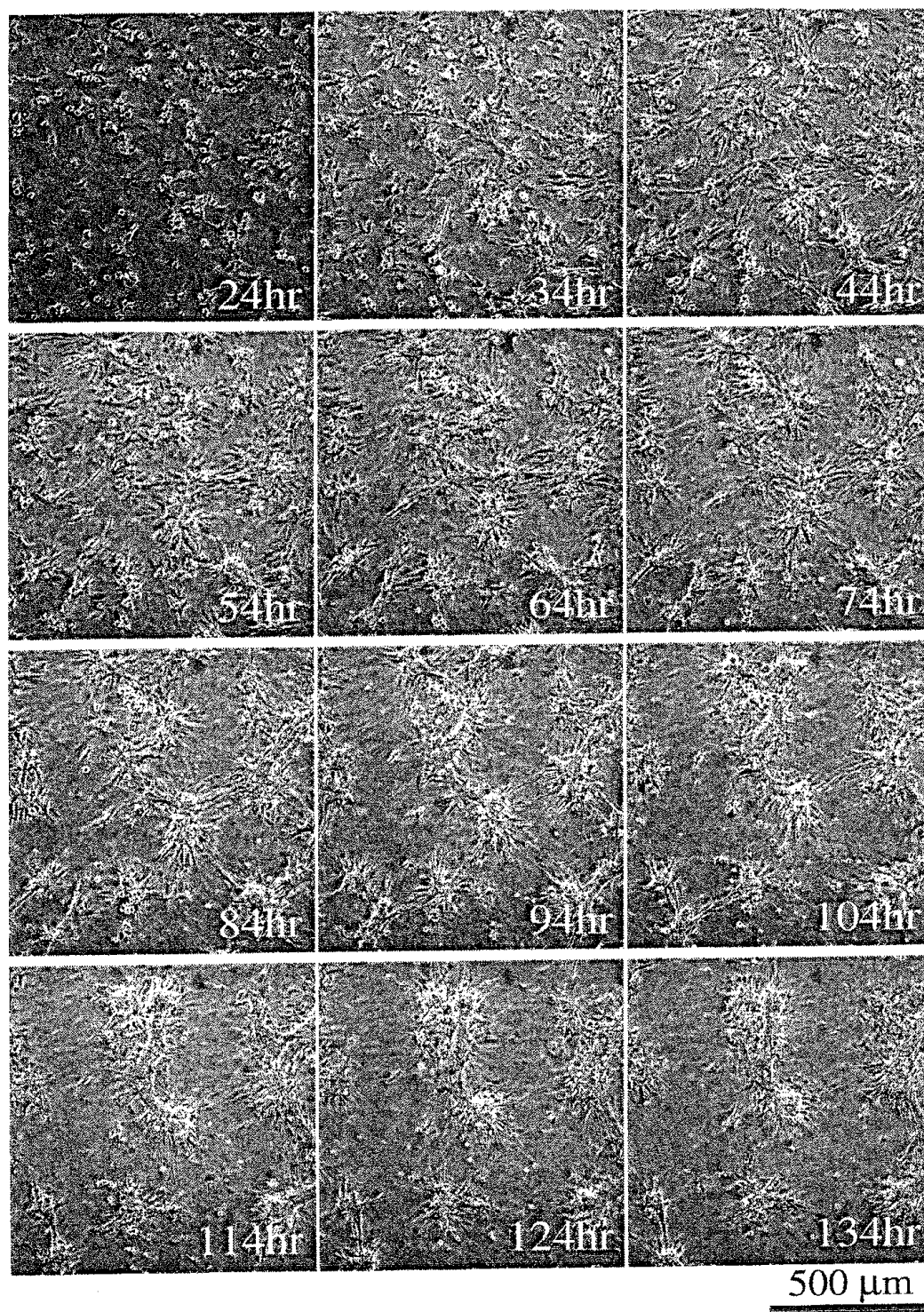


図 1: ラット心臓細胞の初代培養系におけるクラスター形成過程。培養開始からの各時刻における、培養系の透過光顕微鏡像を示す。右下はスケールバー。

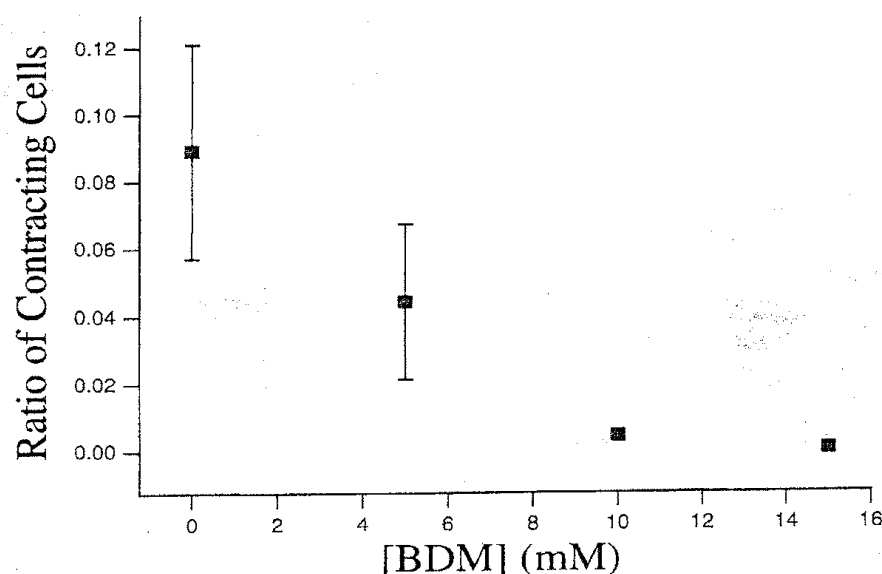


図 2: BDM 存在下で培養 2 日目において、自発的に拍動運動している細胞の個数比率。横軸には培地に加えた BDM の濃度、縦軸は全細胞のうち自発的に収縮している細胞の個数比を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

成された特徴的なクラスターの大きさが、細胞密度と BDM 濃度に対してプロットされている。この図から分かるように、細胞の撒き込み密度が高いほど、形成されるクラスターが大きいと言える。また培地に加える BDM の量が 5mM 以下であればある程度の大きさのクラスターが形成されるのに対し、10mM 以上の BDM 濃度では細胞密度によらず、クラスターの形成は殆ど見られなかった。

4 議論

実験結果のまとめ ここで見られたクラスター形成の現象について、実験結果をもう一度整理しておく。まず、クラスターは収縮を繰り返したくさんの心筋細胞が含まれている事が分かるのに対して、クラスターの外部にいる細胞は収縮運動はせず、また活発に動き回っていることから繊維芽細胞などの自走性の細胞であると推察される。つまりこの現象は初期に比較的一様に分布していた心筋細胞がクラスターを形成し、凝集していく過程であると考えられる。ただし自走性の細胞達はクラスターから完全に排斥されてしまったわけではなく、心筋のクラスター形成に伴って一緒に取り込まれているようである。

心筋細胞の拍動を阻害するとクラスターの形成が見られなくなったことから、分離が起こるメカニズムとして、心筋細胞の拍動による張力を考えることができる。心筋細胞はその内部に sarcomere 構造を持ち、アクチンミオシンの相互作用によって収縮力を生み出している。二つの心筋細胞が結合して拍動する際に、お互い強く引き合うことによって両者の間に実効的な引力が発生し、これが心筋細胞同士の凝縮を駆動していると考えられる。

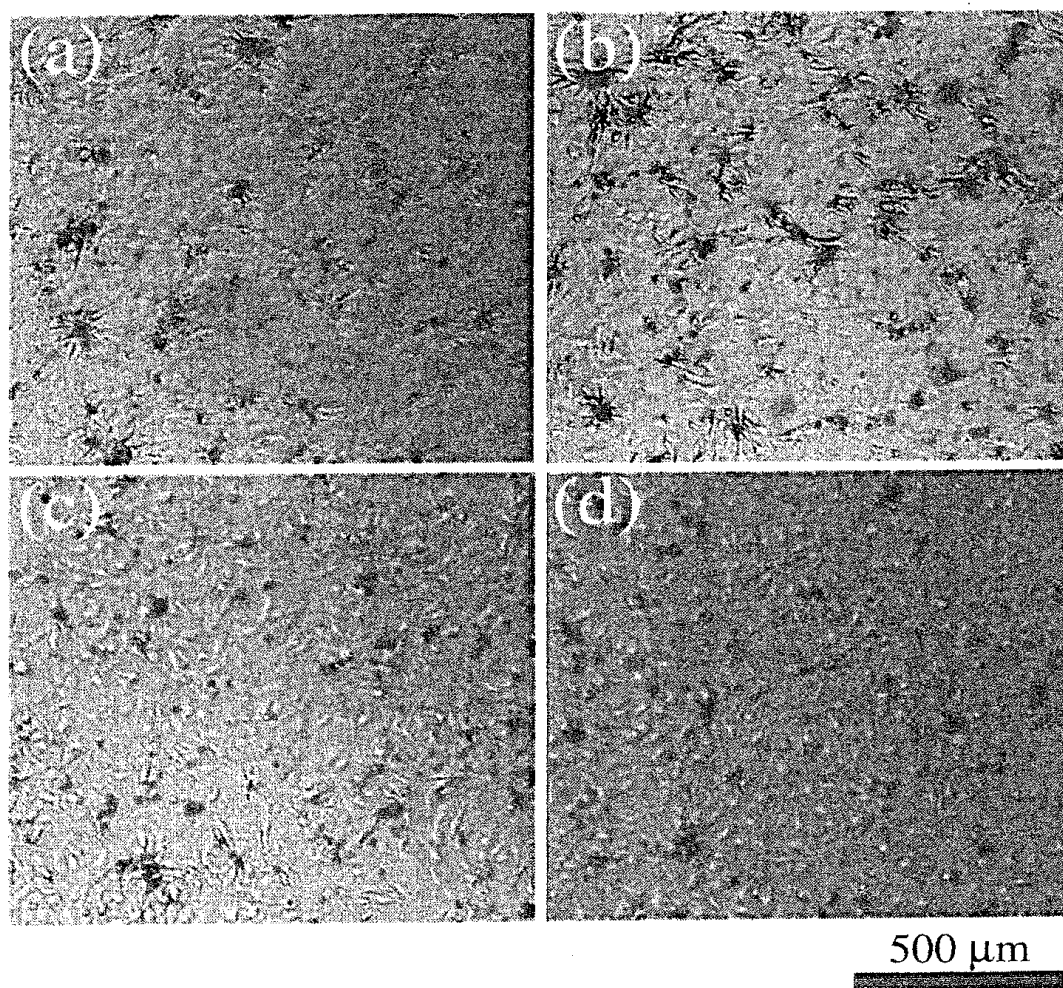


図 3: BDM 存在下で培養 5 日目における、細胞の様子。各濃度における透過光顕微鏡像を示す。BDM 濃度はそれぞれ、a) 0mM, b) 5mM, c) 10mM, d) 15mM。右下はスケールバー。

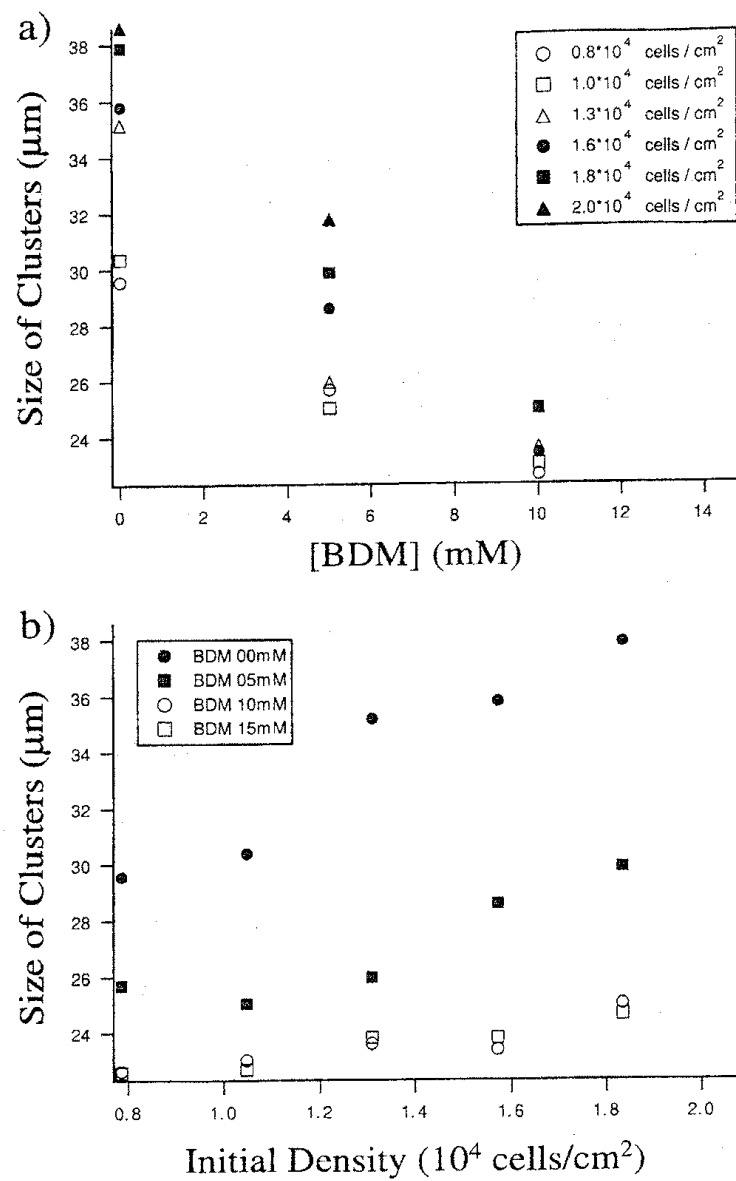


図 4: 各培養条件において、5 日目に形成されたクラスターの平均サイズ。a) 培養初期の細胞密度を一定にして、BDM の濃度を変えた場合。各マーカーは異なる細胞密度に対応する。b) 培地に加える BDM 濃度を一定にして、初期の細胞密度を変えた場合。各種のマーカーは異なる BDM 濃度に対応する。

ところでFig. 2に見られるように、BDM非存在下においても培養初期では自発的に拍動する細胞の比率は一割程度と低い。これらの細胞は心室内に存在していたペースメーカー細胞であると考えられる。一方培養の後期においては、クラスターに含まれる非常に多数の細胞が拍動している。つまりクラスター化の進行に伴って、非自励的な心筋細胞たちがペースメーカー細胞との結合を獲得し、振動するようになったと考えられる。この意味で今回見られたクラスター化現象は、個々の細胞の収縮運動と、系全体のマクロな構造形成とが互いにフィードバックする事によって起こる現象であると言える。

粘弾性相分離とのアナロジー 今回の実験においてはFig. 1のように、分離の途中段階において特徴的なネットワーク構造が見られたが、この構造は高分子などの相分離過程で見られる粘弾性相分離現象で見られる過渡的なネットワーク構造に非常によく似ている [9]。移動度が大きく異なる二種類の液体の相分離過程においては、過渡的に特徴的なネットワーク構造が見られることが知られており、粘弾性相分離現象と呼ばれている。高分子の粘弾性相分離現象は、二種類の液体の動的特性が大きく違うために、緩和の遅い成分に大きなstressがかかり、過渡的なネットワーク構造が形成される、と説明されている。

本研究で扱っている系においても以下のような点に注目すると、上記のような粘弾性相分離が起こる条件を満たしていることが分かる。今の系は、収縮に伴って凝集していく心筋細胞と、分裂して数を増やしていく繊維芽細胞などの細胞から構成されている。心筋細胞は収縮運動はするものの自走性はないが、他方、繊維芽細胞などは自走性を持ち、クラスター形成がおこる時間スケールに比べると非常に早く動き回る。細胞の運動はエネルギー消費を伴って起こるので、通常の相分離過程で扱われているような熱運動ではないが、細胞内でのエネルギー消費を伴った生化学的なプロセスにおける短い時間スケールと、相分離の起こる非常に長い時間スケールとの中間に観測の時間スケールがあることから、これらの細胞の運動をある一定の温度でおこる熱運動に対応させる事ができる。すると、心筋細胞は遅い緩和を持つ成分、繊維芽細胞は速い緩和を持つ成分であると解釈でき、遅い成分に強い引力がかかり、ネットワーク構造が形成されることになり、上述した粘弾性相分離のモデルで解釈することが可能になると考えられる。ただし、高分子の相分離のように保存系でおこる相分離過程と、今の系のように増殖して増える成分を持つ、非保存系での分離過程は本質的に異なる側面も有していると考えられ、今後の課題である。

5 結論および今後の課題

本論文では、ラット心臓の初代培養系において観測された、細胞のクラスター形成について述べた。ここで述べた実験から、培養系に含まれる心筋細胞がその拍動によってお互いの間に張力を生み出し、寄り集まることによってクラスター形成が起こるというメカニズムが結論された。また培養初期には心筋細胞の拍動はランダムであったが、クラスターの形成に伴って次第に全体的に同期した拍動が見られるようになった。これらのことから、ここで見られたクラスター形成現象においては、個々の細胞の拍動という速いダイナミクスによって、より遅い時間スケールにおいて細胞の分布と結合状態の

変化が駆動され、またそれにつれて心筋細胞間の結合が増えて、細胞の拍動という速いダイナミクスが影響を受ける、というフィードバックの効果が見られた。

今回は細胞種を生化学的に特定することが出来ていなかったが、今後の課題として、タンパク質の発現分布などからクラスター構造における細胞の分布をより詳しく測定する必要がある。また今回はクラスター形成についての非常に遅い時間スケールに主に着目していたが、心筋細胞の拍動ダイナミクスをより定量的に測定し、クラスター形成と拍動ダイナミクスの変化について調べることも興味深い問題である。

また、拍動によって細胞の分布が影響を受けるであろうという考え方は、今回調べた培養系だけに限らず適用できるものと期待される。特に実際の発生過程の問題として、心臓の形成に対して心筋細胞の拍動そのものが与える効果を調べることは非常に興味深い。生物の発生のメカニズムを明らかにするうえで、ここで述べたような非線形力学系の考え方は今後もその重要性を増していくものと予想される。

6 謝辞

細胞培養系の実験については、東京大学大学院総合文化研究科の跡見順子教授と大戸恵理博士に指導して頂きました。また Institut Non Lineaire de Nice の V. Krinsky 教授、Fritz-Haber Institut の A. Mikhailov 教授、京都大学大学院医学研究科先天異常解析センターの三浦岳博士、京都大学大学院理学研究科の磯村彰宏氏および吉川研一教授には有用な議論と示唆をいただきました。この研究は日本学術振興会の援助を得て行っています（特別研究員 No. 05494）。

参考文献

- [1] L. Glass, P. Hunter and A. McCulloch eds., *Theory of Heart: Biomechanics, Biophysics, and Nonlinear Dynamics of Cardiac Function* (Springer-Verlag, New York, 1990).
- [2] Y. Soen, N. Cohen, D. Lipson, and E. Braun, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 3556 (1999).
- [3] G. Bub, A. Shrier, and L. Glass, *Phys. Rev. Lett.* **88**, 058101 (2002).
- [4] A. Arutunyan, A. Pumir, V. Krinsky, L. Swift, and N. Sarvazyan, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **10**, 1152 (2003).
- [5] K. Kojima, H. Moriguchi, A. Hattori, T. Kaneko, and K. Yasuda, *Lab on a Chip* **3**, 292 (2003).
- [6] T. Li, R. E. Sperlakis and J. Solaro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 688 (1985).
- [7] S. Matoba, T. Tatsumi, N. Keira, A. Kawaharra, K. Akashi, M. Kobara, J. Asayama and M. Nakagawa, *Circulation* **99**, 817 (1999).
- [8] H. Fujita and S. Ishiwata, *Biophys. J.* **75**, 1439 (1998).

- [9] H. Tanaka, J. Phys.: Condes. Matter **12**, R207 (2000).